

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

THAMYRES ROLLEMBERG ABOUD ARABI

**Otimização da injetabilidade de uma pasta de β -TCP para fabricação de
*scaffolds por robocasting***

São José dos Campos

2019

THAMYRES ROLLEMBERG ABOUD ARABI

**Otimização da injetabilidade de uma pasta de β -TCP para fabricação de
scaffolds por *robocasting***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Paulo como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Mariana Motisuke

São José dos Campos

2019

THAMYRES ROLLEMBERG ABOUD ARABI

**Otimização da injetabilidade de uma pasta de β -TCP para fabricação de
scaffolds por *robocasting***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Paulo como requisito
parcial para obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia de Materiais.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Mariana Motisuke

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

Orientador

Prof. Dr. Eliandra de Sousa Trichês

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

Na qualidade de titular dos direitos autorais, em consonância com a Lei de direitos autorais nº 9610/98, autorizo a publicação livre e gratuita desse trabalho no Repositório Institucional da UNIFESP ou em outro meio eletrônico da instituição, sem qualquer ressarcimento dos direitos autorais para leitura, impressão e/ou download em meio eletrônico para fins de divulgação intelectual, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNIFESP São José dos Campos com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Arabi, Thamyres R A.

Otimização da injetabilidade de uma pasta de β -TCP para fabricação de *scaffolds* por *robocasting*/ Thamyres Rollemberg Aboud

Arabi.

33 f.

Trabalho de conclusão de curso graduação em Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Paulo, Instituto de Ciência e Tecnologia, 2019.

Orientador: Mariana Motisuke

Injectability optimization of a β -TCP paste for scaffolds fabrication by robocasting

1. β -TCP. 2. impressão 3D. 3. Injetabilidade. 4. *robocasting*. I. Motisuke, Mariana. II. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de São Paulo, Instituto de Ciência e Tecnologia. III. Desenvolvimento de uma pasta de β -tcp injetável para a engenharia tecidual óssea.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à **Deus** por me dar força para encarar mais uma etapa da minha vida com tanta garra e determinação. A minha avó que sei que está a me proteger diante de cada passo que avanço em minha vida.

Agradeço aos meus familiares, principalmente **Valéria Rollemberg, Eduardo Chainça, Andréia Rollemberg, Lupita e Alice Rollemberg** por cada incentivo, companheirismo e compreensão pela minha ausência durante datas familiares importantes, tornando esta etapa em minha vida possível e alcançável. Graças à vocês eu continuo persistindo, vocês definitivamente são minha base.

Grata pelos meus amigos, em especial **Thamires Carvalho, Maíze Santos e Victor Ribeiro** que estiveram ao meu lado durante minha trajetória acadêmica, ajudando, motivando e ouvindo meus desabafos, a faculdade ficou mais “leve” com vocês ao meu lado.

Aos colegas do laboratório de Bioceram, pelo auxílio durante todos os dias em que estive no laboratório. Agradecimento especial à **Ana Paula Nogueira** por toda paciência e ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Sou grata a todos os professores que contribuíram de alguma forma para o sucesso da minha trajetória acadêmica, especialmente a **Mariana Motisuke**, responsável pela orientação do meu projeto. Obrigada pelos esclarecimentos perante minhas dúvidas e por ser atenciosa comigo.

À professora **Eliandra de Sousa Trichês** que participou da minha banca examinadora e pelos comentários e correções durante o progresso da minha pesquisa que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

RESUMO

Com o passar dos anos, a medicina procurou a melhoria contínua na qualidade de vida dos pacientes e as novas tecnologias têm colaborado com os profissionais desta área, tornando a busca por conhecimento de novas técnicas cada vez maior. Diante do avanço tecnológico, o uso da impressão 3D vem demonstrando grande ascensão na área da fabricação de implantes e *scaffolds* com geometrias complexas e sob medida para as necessidades de cada paciente e, biomateriais materiais diretamente injetáveis desenvolvidos para procedimentos minimamente invasivos para preencher defeitos ósseos ou melhorar a resistência mecânica de um osso com osteoporose. Neste projeto pretende-se utilizar o beta fosfato de tricálcio (β -TCP), um material com excelente bioatividade e capacidade de regeneração óssea, para desenvolver uma pasta injetável que possa ser utilizada tanto na impressão 3D. Para isso, foi preparada uma pasta de β -TCP a partir de sua mistura com uma solução contendo alginato de sódio de baixa viscosidade. As pastas foram testadas quanto a sua porcentagem de injetabilidade. Visando a melhoria dos resultados, foi realizado um planejamento de experimentos considerando a porcentagem em massa de sólidos (β -TCP), a concentração de alginato (1 e 2% em massa) e o uso ou não de PEG, evidenciando a influência de cada fator e a interação entre eles na formulação ótima da pasta de β -TCP. Os resultados do planejamento fatorial mostraram que a % de sólidos, a concentração de alginato de sódio e a interação entre eles são os fatores que mais influenciam na injetabilidade da pasta. De fato, as formulações contendo 60% de sólidos e 2% de alginato foram as que alcançaram maior injetabilidade. Apesar da presença de PEG não ser determinante para a injetabilidade das pastas, este aditivo é primordial para o processo de *robocasting* já que garante a aderência entre as camadas impressas. Sendo assim, a formulação ótima obtida neste trabalho foi 60% de sólidos, 2% de alginato e 2,5% em massa da PEG.

Palavras-chaves: β -TCP, pastas cerâmicas, injetabilidade, *robocasting*, impressão 3D.

ABSTRACT

Over the years, medicine has sought to continuously improve the quality of life of patients and new technologies have collaborated with professionals in this area, making the search for knowledge of new techniques increasing. In the face of technological advancement, the use of 3D printing has shown a great rise in the area of manufacturing implants and scaffolds with complex geometries tailored to the needs of each patient and directly injectable biomaterials developed for minimally invasive procedures to fill bone defects or improve the mechanical strength of a bone with osteoporosis. In this project we intend to use tricalcium beta phosphate (β -TCP), a material with excellent bioactivity and bone regeneration capacity, to develop an injectable paste that can be used in both 3D printing. For this, a β -TCP paste was prepared by mixing it with a solution containing low viscosity sodium alginate. The pastes were tested for their percentage of injectability. In order to improve the results, a design of experiments was performed considering the mass percentage of solids (β -TCP), the alginate concentration (1 and 2% by mass) and the use or not of PEG, showing the influence of each factor and the interaction between them in the optimal formulation of the β -TCP paste. The factorial design results showed that% solids, sodium alginate concentration and the interaction between them are the factors that most influence the injectability of the paste. In fact, formulations containing 60% solids and 2% alginate achieved the highest injectability. Although the presence of PEG is not a determinant for the injectability of the pastes, this additive is paramount to the robocasting process as it ensures the adhesion between the printed layers. Thus, the optimal formulation obtained in this work was 60% solids, 2% alginate and 2.5% by weight of PEG.

Key-words: β -TCP, hydrogel, injectability, robocasting, 3D printing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Ordem dos experimentos realizados.....	22
Figura 2 - Teste com aplicação da seringa na mini injetora.....	23
Figura 3- Análise DRX do β -TCP sintetizado e pasta de β -TCP com condições diferentes.	26
Figura 4- Gráfico de Pareto.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ordem de experimentos gerados pelo Minitab	24
Tabela 2- Cálculo para injetabilidade da pasta.....	27
Tabela 3 - Coeficientes Codificados e valor-p	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -TCP	[alfa]-Fosfato tricálcico, α -Ca ₃ (PO ₄) ₂
β -TCP	[beta]-Fosfato tricálcico, β -Ca ₃ (PO ₄) ₂
3D	Tridimensional
DRX	Difração de raios-X
ICDD	Centro Internacional de Dados de Difração (International Center for Diffraction Data)
PEG	Polietilenoglicol
TCP	Fosfato Tricálcio
TE	Engenharia Tecidual

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μm	Micrômetro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Engenharia tecidual	15
3.4	Fosfato de cálcio	17
3.5	<i>Scaffolds</i>	18
3.6	Manufatura aditiva: <i>Robocasting</i>	19
3.7	Injetabilidade	19
3.8	Alginato de sódio	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Material	21
4.1.1	Matérias-primas	21
4.1.2	Aditivos de processamento	21
4.2	Métodos	21
4.2.1	Preparação da pasta	21
4.2.2	Determinação da injetabilidade	22
4.3	Caracterização das pastas de β -TCP	24
4.3.1	Difração de raio X	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1	Análise de DRX	26
5.2	Formulação Otimizada	27
6	CONCLUSÃO	30
7	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Diante dos avanços tecnológicos e os avanços da medicina observa-se um significativo aumento na expectativa de vida do homem no século XX e, conseqüentemente, a população de idosos vem crescendo juntamente com as taxas de enfermidades crônico-degenerativas, dentre elas, pode-se citar a osteoporose e a perda de massa óssea, que invariavelmente levam à fraturas e a dores crônicas, interferindo diretamente na qualidade de vida das pessoas. No entanto, tais problemas, afligem não somente os idosos como também os jovens, em decorrências de acidentes automobilísticos e também de trabalho, obesidade e sedentarismo que influencia inflamação e dores no paciente [1,2].

Baseado nesses avanços, a ciência que estuda os biomateriais tem atuado de forma ativa no desenvolvimento de novas opções de implantes que possam atuar na regeneração do tecido ósseo melhorando a mobilidade e diminuindo a dor dos pacientes. Um exemplo é o desenvolvimento de arcabouços porosos (*scaffolds*) para a engenharia tecidual, potencializando desta forma o reparo do tecido e/ou a manutenção óssea, que obterão sucesso caso as interações entre células e o material do *scaffold* ocorram [3-5].

O beta fosfato tricálcico (β -TCP) é uma cerâmica reabsorvível e bioativo que possui uma grande aplicabilidade na área ortopédica e odontológica devido à sua boa biodegradabilidade e osteocondutividade, tendo neste caso, composição similar com a parte mineral dos ossos e dentes. Este material pode ser usado na forma de grânulos ou de peças densas e porosas para preenchimento e/ou reconstrução de falhas nas paredes ósseas, traumas, degeneração, dentre outras utilizações em ortopedia e traumatologia [7,8].

Em casos particulares para resolver problemas ósseos, o uso de auto enxerto é indicado pois atua como substituto no tecido lesionado, mas esse tipo de solução nem sempre encontra-se disponível ao paciente. Perante esse desafio, uma opção válida é a inserção de suporte temporário produzido a partir de um biomaterial específico, este deve ser capaz de estimular uma melhor cicatrização, conhecido como *scaffolds* [9]. Trata-se de um substrato tridimensional capaz de gerar uma maior estabilidade mecânica, facilitando processos de proliferação, diferenciação das células e crescimento tecidual, além de estimular a regeneração específica de cada tipo de tecido do organismo [9,10].

A manufatura aditiva tem sido amplamente utilizada para a fabricação de *scaffolds* personalizados já que permite a fabricação camada a camada a partir de um modelo computacional

obtido a partir de exames de imagens biomédicas. Como o progresso desta tecnologia torna-se viável a fabricação de implantes e de *scaffolds* para reparar e reconstruir lesões ósseas, de acordo com as necessidades de cada paciente. Dentre as tecnologias de manufatura aditiva existentes o *robocasting* destaca-se por ser simples e acessível permitindo o uso de materiais cerâmicos na forma de pasta. Assim, para a fabricação de *scaffolds* cerâmicos bioativos torna-se indispensável o desenvolvimento de pastas com elevada injetabilidade.

Contudo, para que haja uma melhor fluidez da pasta injetável, é necessário utilizar um aditivo polimérico, como o alginato de sódio, que seja capaz de aperfeiçoar suas propriedades mecânicas e reológicas além de melhorar a moldabilidade e a injetabilidade da pasta [9].

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

O uso do *robocasting* para a fabricação de *scaffolds* biocerâmicos, dentro da área de engenharia tecidual é um campo bastante promissor devido à sua capacidade de tratar o tecido ósseo e/ou evitar a necessidade de interferência cirúrgica demasiadamente invasiva, trazendo benefícios e mais qualidade de vida à pessoas que sofrem com defeitos no tecido ósseo.

O desafio desta abordagem está no desenvolvimento de pastas cerâmicas com elevada injetabilidade e coesão e que resultem na impressão de peças com elevada resistência mecânica a verde e que mantenham a aderência entre cada camada extrudada. Assim, o objetivo deste trabalho foi através do uso do planejamento de experimento otimizar a injetabilidade de uma pasta de β -TCP contendo alginato de sódio que será utilizada para impressão de *scaffolds* por meio do *robocasting*.

Como objetivos secundários pretendeu-se:

- Avaliar a influência do uso do polietilenoglicol (PEG) e do alginato de sódio na injetabilidade;
- Otimização a % de sólidos na composição da pasta de β -TCP.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Engenharia tecidual

Nas últimas décadas, sucedeu um grande aumento nas pesquisas tecnológicas, incluindo diversas ideias criativas e desenvolvimento de novas tecnologias para reparação ou substituição de tecidos que estivessem doentes/danificados, essa ocorrência levou ao surgimento de uma nova área tecnológica no âmbito da saúde, conhecido como, engenharia tecidual [11].

De modo geral, mesmo que as técnicas utilizadas cirurgicamente possam reparar ou corrigir um problema ósseo, vindo salvar e melhorar a vida dos pacientes, não são soluções eficazes, visto que existem algumas limitações como falha da célula para manter suas funções nos receptores e rejeição imunológica [4,12]. Desse modo, a engenharia tecidual oferece a possibilidade de economias futuras, uma vez que os métodos atuais de transplantes se qualificam como os métodos mais caros disponíveis hoje.

A engenharia tecidual (TE) trata-se de uma aplicação de métodos e princípios de engenharia e ciências voltados à compreensão da estrutura complexa dos tecidos do corpo humano, que incorporam células vivas e fatores bioquímicos com objetivo de ser capaz de desenvolver substitutos com estruturas artificiais que sejam materiais bioativos, normalmente poliméricos ou cerâmicos, a fim de restaurar ou melhorar/reparar tecido e/ou órgão, sendo uma área com um potencial grande em medicina regenerativa [11,13]. Atualmente os produtos criados são utilizados em ortopedia e aplicações cirúrgicas [14].

Caso o material seja poroso, fará com que haja um fortalecimento entre o implante e o osso, sendo esperado que esses materiais degradem com o tempo, porém sem que perca a força conforme envelhece [12]. Também é necessário que possua algumas propriedades como adesão e migração celular, função mecânica e biológica para usos específicos além de ser bioativo e bioabsorvível [4].

De modo histórico, os biomateriais foram utilizados pela primeira vez 4000 a.C pelos egípcios em placas metálicas em reparos de lesões cranianas e também em membros artificiais [15].

Contudo, foi a partir do século XX, que o uso dos biomateriais foi impulsionado, durante o período das guerras mundiais, mudando o conceito de tratamento de diversas doenças, porém,

foi no século XXI que houve um aumento na demanda e passou a ser utilizado em diversas áreas como na odontologia, medicina e biotecnologia [16,17].

Atualmente, os biomateriais são definidos como substâncias de origem sintética ou natural, com objetivo de entrar em contato com o sistema biológico a fim de suprir partes danificadas ou enfermas, substituindo tecido, órgão ou função do corpo [16,18,19]. No cotidiano, podem ser usados em aplicações médicas, melhorando a qualidade de vida de muitos pacientes, como também em substituição de membros e articulações, curativos, dentre outros [19,20].

Um biomaterial precisa ser biocompatível, ou seja, quando há interação do sistema biológico sem que haja rejeição do material no corpo. Isso acontece por conta da compatibilidade com propriedades químicas e físicas entre o material a ser utilizado e o sistema biológico. O intuito é que não seja prejudicial ao paciente, sendo assim, a interação entre o material e o sistema biológico não podem causar reações colaterais [21].

Os biomateriais podem ser aplicados com materiais de natureza metálica, polimérica, cerâmica e por compósitos. Para resolução de problemas ósseos os materiais mais frequentes são os materiais cerâmicos, conhecidos como biocerâmicas, no qual será abordado neste projeto [1,16].

De acordo com pesquisadores, foi em 1894 a primeira vez que se utilizou a cerâmica em procedimentos médicos, por tratar-se de um composto cristalino com elementos inorgânicos não metálicos, como biomaterial, este foi usado como gesso em uma tentativa para substituição óssea, porém o gesso possui baixa resistência mecânica e possui uma alta absorção dada pelo corpo humano, com isso, seu uso como biocerâmicas não pode ser realizada [1]. Em suma, uma das aplicações é para o reparo e reconstrução de partes do corpo humano que possa estar doente ou danificado, denominado biocerâmicas, devido a suas excelentes propriedades, sendo a biocompatibilidade, osteocondutividade, alta rigidez, dentre outras [22,23].

A princípio as biocerâmicas tinham o intuito de superar alguns problemas de biocompatibilidade dos materiais metálicos que eram implantados pois em meio fisiológico muitos metais oxidam e como consequência dores e inflamações no corpo do paciente. Porém em biocerâmicas isso não ocorre devido a sua alta inércia química superando as limitações [24,25].

As biocerâmicas podem ser classificadas a partir do seu comportamento com o tecido vivo ou implante em: [1, 3, 24, 26]

- Bionertes: há uma baixa resposta biológica aplicada com tecido vivo. Exemplo: alumina e zircônia.

- Bioativas: ao induzir esse material induz uma resposta na superfície do tecido vivo com implantes biológicos, permite desta forma, a deposição de células. Como por exemplo: biovidro.
- Porosas: favorecem a formação dos tecidos internos por conta de sua morfologia.
- Reabsorvíveis: ao serem implantadas, se dissolvem com o tempo e são substituídas gradativamente pelo tecido. Este material permanecerá no corpo enquanto sua função é precisa e desaparecerá conforme o tecido se regenera, como por exemplo: o fosfato tricálcio.

Tais classificação da biocerâmicas, podem ser distribuídas conforme sua evolução, levando em consideração os avanços de conhecimentos que sucederam com a resposta do organismo a nível celular e molecular.

3.4 Fosfato de cálcio

Compostos de fosfatos de cálcio são estudados por décadas, como materiais para remodelação óssea. A primeira utilização *in vivo* de fosfato tricálcio foi feito por Albee & Morrison em 1920 [27]. Subsequentemente, várias partículas de fosfato de cálcio foram injetadas nos animais para que pudessem ser testados seus efeitos de cicatrização de ossos [28].

Em busca de materiais que contenham uma grande semelhança química com mineral dos ossos e dos dentes, as biocerâmicas de fosfatos de cálcio tem se destacado para a substituição e reparação do tecido ósseo por ser biocompatível, osteocondutor e bioativo, parte dos estudos e aplicações voltados para o fosfato de cálcio são baseados no uso de hidroxiapatita, α -fosfato tricálcio e β -fosfato tricálcio. Devido a isso, a interação que ocorre entre o tecido vivo e o material possui uma forte ligação na superfície do biomaterial-tecido, ocorrendo uma semelhança mineralógica do tecido ósseo [29].

No entanto, o modo de classificar o fosfato de cálcio pode ocorrer através da razão atômica Ca/P, porém as aplicações na área biomédica não podem ser aplicadas em qualquer caso pois alguns casos ocorrem em Ca/P menor que 1, e consequentemente possui uma grande solubidade e acidez [27].

Este trabalho será baseado no fosfato tricálcio (TCP) por ser um composto bioreabsorvível com fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, com a razão $\text{Ca/P} = 1,5$, sendo este, um composto neutro com seis cargas positivas dos íons Ca^{2+} , sendo compensadas por seis cargas negativas de PO_4^{3-} , aplicados na ortopedia e odontologia [30].

O fosfato tricálcico trata-se de um material que possui quatro tipos de polimorfismo (α , α' , β e γ), isso significa que possui estruturas cristalinas distintas, podendo ser obtidos através de reação no estado sólido ou pela calcinação, a fase β cristaliza no sistema hexagonal [31]. O TCP é aplicado em situações onde a taxa de degradação do material é necessária, incluindo o preenchimento de defeito ósseo [32].

A fase utilizada neste projeto será o β -fosfato tricálcio sendo este o estável desde a temperatura ambiente até que alcance de aproximadamente 1150°C quando a partir disto, inicia-se a transformação para a fase α [31].

3.5 *Scaffolds*

Os *scaffolds* ou arcabouços são biomateriais com estruturas porosas tridimensionais que permitem que as células se desenvolvam ao longo de seus poros, ou seja, fornece o suporte estrutural para o tecido novo.

Os *scaffolds* são usados para reconstrução e restauração de defeitos anatômicos de órgãos complexos e tecidos funcionais, fornecendo um modelo para reconstrução de defeitos, promovendo uma fixação celular, geração de matriz extracelular, restauração de músculos, nervos, etc [33].

Sendo ideais para modelos de tecidos, replicando a complexidade estrutural dos tecidos vivos. Desse modo, não somente o biomaterial utilizado, mas também a macro, micro e nano-arquitetura dos *scaffolds* são de primordial importância.

Os *scaffolds* são ideais para o crescimento do tecido devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade controlável, microestrutura adequada (tamanho e porosidade) e suas propriedades mecânicas [34].

Distintas técnicas de impressão 3D têm sido exploradas na fabricação de estruturas porosas biocompatíveis para a engenharia de tecidos ósseos, capaz de produzir várias estruturas porosas [34,35]. Para a produção de *scaffolds*, o método de *robocasting*, é uma técnica de impressão 3D, sendo este um dos tipos de manufatura aditiva, sendo utilizados na produção de *scaffolds* personalizados de acordo com a necessidade de cada paciente, possibilitando a construção de estrutura com porosidade que são interconectadas [36].

3.6 Manufatura aditiva: *Robocasting*

A impressão 3D ou manufatura aditiva (*Additive Manufacturing – AM*) é uma técnica de grande destaque nos últimos anos, pois permite a criação de objetos de forma tridimensional, em que é feito a impressão camada por camada, de acordo com a determinação do modelo virtual, tendo a vantagem do controle exato da arquitetura do *scaffolds* e da reprodutibilidade do material ao comparar com técnicas tradicionais [37,38].

Para o primeiro passo do processo do *robocasting* é necessário controlar a injetabilidade e a viscosidade da pasta que será usada por meio da adição de polímeros viscosos, como no caso deste trabalho, o alginato. Normalmente a pasta apresenta uma elevada porcentagem de sólidos, o que ajudará na densificação e em seguida no tratamento por sinterização [38].

No segundo passo, é importante que haja controle nas condições da impressão, conforme a viscosidade da pasta, para isso, é necessário estabelecer a altura entre camadas, velocidade de corte, assim como a velocidade para finalizar a camada impressa e dar sequência à camada seguinte [37,38].

A vantagem na utilização do *robocasting* para impressão de matrizes cerâmicas é que não precisa utilizar a etapa de limpeza, de remoção dos pós que ficam soltos.

3.7 Injetabilidade

Através de estudos de Montufar e colaboradores [40] foi possível analisar a reação de pega sobre a injetabilidade de pastas comparando com pastas de fosfato tricálcio (TCP) ao utilizar pastas não reativas de β -TCP e pastas reativas de α -TCP, uma não dá pega e a outra dá pega, respectivamente. Observou-se através dos estudos que a reatividade do pó pôde desempenhar um papel importante na injetabilidade, uma vez que o α -TCP aumenta a viscosidade e consequentemente reduz a injetabilidade. Deve-se levar em consideração no processo de injetabilidade a razão líquido/pó, assim como a morfologia das partículas, viscosidade da fase líquida e seu limite elástico

[39].

Para medir a injetabilidade alguns autores se basearam na equação 1 demonstrada abaixo [40] como a porcentagem de massa de pasta injetada em relação a massa inicial da pasta da seringa.

$$I(\%) = \frac{\text{massa da pasta injetada pela seringa}}{\text{massa da pasta seringa original}} \times 100$$

Equação 1

3.8 Alginato de sódio

O alginato é um polímero de ocorrência natural, geralmente obtido a partir de algas marrons. Usado e estudado para ser aplicado como um biomaterial por conta da sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, gelificação moderada além de ter um custo relativamente baixo [41]. O alginato pode ser aplicado em diversas aplicações biomédicas e além de ter grande destaque em áreas de cicatrização de feridas, administração de drogas e engenharia de tecidos [41].

Os alginatos podem ser utilizados como veículo injetável para a formação do tecido em cirurgias minimamente invasivas, isso ocorre devido ao gel fluir como líquido quando injetado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matérias-primas

- β -TCP: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$ foi sintetizado previamente no Laboratório de Biomateriais (Bioceram) da Universidade Federal de São Paulo, através da reação em estado sólido a 1050°C do carbonato de cálcio e fosfato de cálcio bifásico anidro, na proporção de 1:2. O pó obtido foi moído via úmida por 12 horas em moinho de bolas horizontal e peneirado em peneira de abertura 200 MESH (0,075mm). O pó final foi analisado em um granulômetro resultando em um tamanho médio de partícula equivalente a $1,93\text{ }\mu\text{m}$ e distribuição entre 0,63 e $3,22\text{ }\mu\text{m}$.

4.1.2 Aditivos de processamento

- $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$, Alginato de sódio baixa viscosidade (Sigma-Aldrich Brasil, Vetec, Lote DCBC6677V, Duque de Caxias – RJ).
- $\text{C}_{2n}\text{H}_{4n}+2\text{O}_n+1$, Polietileno glicol 400 P.A. – PEG (marca Synth).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação da pasta

Foram feitas as pesagens e separação de cada material que foi utilizado no experimento, conforme a Figura 2. Após a determinação da ordem dos ensaios, foi estabelecido o tempo para realização de cada etapa.

Figura 1-Ordem dos experimentos realizados



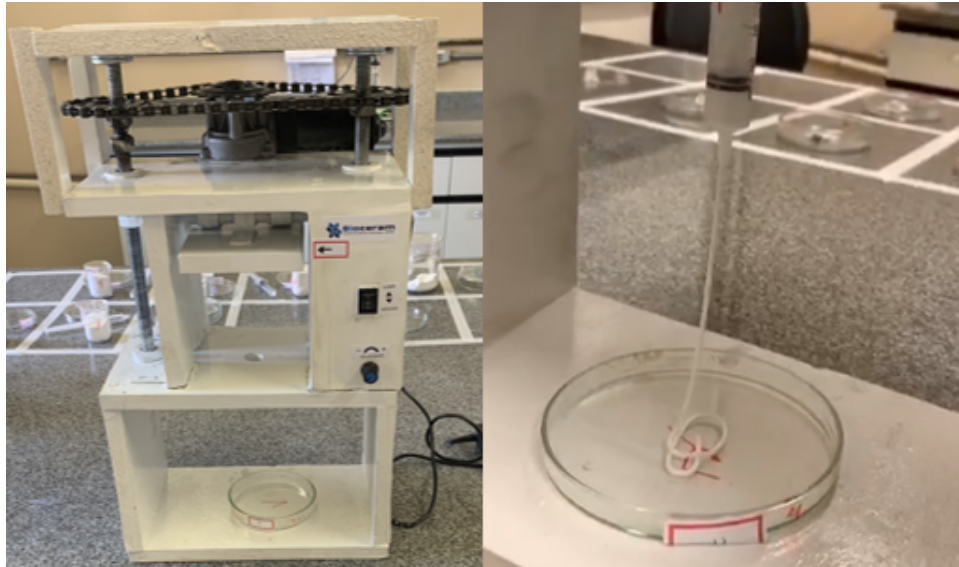
Fonte: Elaboração própria

A mistura do pó e do líquido foi realizada em um agitador mecânico (IKA® RW 28 basic). Primeiramente foi determinado o tempo de mistura fixando 30 segundos para cada vez em que o pó β -TCP foi acrescentado no misturador com 10 g da solução de alginato em um béquer de 50 mL ligou-se a agitação (qual a velocidade) e adicionou-se pequenas quantidades do β -TCP através de uma colher de sopa rasa a cada 30 segundos. Após a adição de todo o β -TCP, dependendo do experimento foi acrescentado ou não o PEG, e, em seguida, a pasta foi misturada em velocidade máxima (colocar qual a velocidade) por 10 minutos, para completa homogeneização, todo o processo ocorreu em temperatura constante de 25°C.

4.2.2 Determinação da injetabilidade

Para determinação da injetabilidade, foram pesados 3 gramas da pasta de β -TCP inseridos em uma seringa com capacidade para 5 mL que foi acoplada em uma mini injetora desenvolvida em nosso laboratório [42]. Foi aplicada pressão constante na seringa durante 22 segundos e a pasta extrudada foi recolhida em uma placa de Petri (Figura 2). A cada nova injeção observou-se o aspecto visual da pasta e a massa extrudada foi medida para que a injetabilidade pudesse ser calculada de acordo com a Equação 1.

Figura 2 - Teste com aplicação da seringa na mini injetora



Fonte: Elaboração própria

4.2.3 – Otimização da injetabilidade da pasta

Para otimizar a injetabilidade da pasta e avaliar a influência que a % de sólidos, a concentração de alginato e a presença ou não de PEG tem no sistema, foi realizado um planejamento de experimentos (DOE), este recurso auxilia na investigação dos efeitos de variáveis de entrada (fatores), em uma variável de saída (variável resposta). Foi feita uma série de ensaios alternando as variáveis de entrada, tendo cada ensaio os dados de injetabilidade coletados. Dessa forma, é possível identificar os fatores que mais influenciam na injetabilidade, otimizando os resultados e tendo um modelo matemático que representa o sistema permitindo futuras simulações.

Foi utilizado o software Minitab® versão 19.2 que oferece cinco tipos de experimentos para realizar as análises, o utilizado nesses ensaios foi o experimento fatorial completo com triplicata no ponto central oferecendo ferramentas gráficas e analíticas para auxiliar a compreensão de cada resultado obtido de forma sistemática, confiável e rápida [43]. O ponto central é uma maneira simples para que seja possível avaliar se existe falta de ajuste, ou seja, comparar com os valores previstos no modelo linear (sem uso do ponto central).

Os fatores foram escolhidos com base em estudos prévios realizados no Laboratório de Bio-cerâmicas sendo o fator A, a quantidade de alginato de sódio (1% e 2% em massa); o fator B, o teor de sólidos (60% e 63 % em massa) e; o fator C, a presença ou não PEG (0 e 2,5% de massa).

Os experimentos foram realizados de forma aleatória de acordo com a Tabela 1 que descreve as combinações do planejamento fatorial e a ordem de execução de cada experimento. Os fatores foram apresentados como – e +, Tabela 1, sendo esta a representação padrão em ensaios fatoriais.

Tabela 1- Ordem de experimentos gerados pelo Minitab

Número do experimento	Ordem de execução	%sólidos	Alginato	PEG
1	0 0 0	61,5	1,5	1,25
2	- - +	60	1	2,5
3	- - -	60	1	0
4	+ - +	63	1	2,5
5	- + +	60	2	2,5
6	0 0 0	61,5	1,5	1,25
7	- + -	60	2	0
8	+ + +	63	2	2,5
9	0 0 0	61,5	1,5	1,25
10	+ - -	63	1	0
11	+ + -	63	2	0

Fonte: Elaboração própria

Foram realizados 11 ensaios ao total devido a triplicata no ponto central, sendo esta a condição de: 61,5% de sólidos, 1,25% PEG, 1,5 alginato, com combinações aleatórias como apresentada na Tabela 1 em que 000 indica o ponto central.

Para cada formulação foi determinada a injetabilidade da pasta e os dados foram analisados com o auxílio do software Minitab® versão 19.2 para verificar a influência de cada fator e a interação entre eles.

4.3 Caracterização das pastas de β -TCP

4.3.1 Difração de raio X

Através da técnica de difração de raio x (DRX) é possível obter informação detalhada sobre dimensões, existência de defeitos e orientação da rede cristalina. A técnica ocorre basicamente, quando um feixe de raios x monocromático (de única frequência) incide sobre o átomo isolado,

elétrons do mesmo são excitados e vibram com a mesma frequência do feixe incidente. Nesse trabalho, a difração de raios X (X'Pert Pro – PANalytical X'Celerator $\text{CuK}\alpha$, filtro de Ni, 10 a 90° (2 θ), 0,02°/s, 40kV e 30mA) foi utilizada para verificar as fases cristalinas formadas na pasta cerâmica.

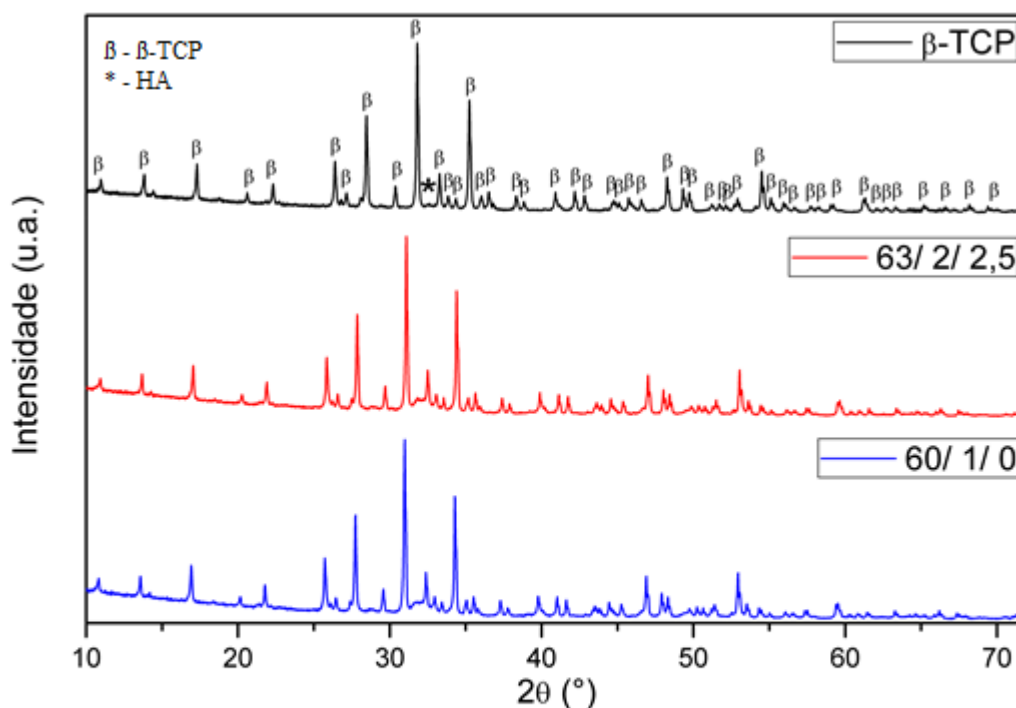
Para realização desta análise foram escolhidas duas amostras de forma aleatória, sendo uma com o uso de PEG e outra sem uso de PEG, a fim de verificar se há alteração no DRX com o a presença ou não de PEG.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise de DRX

A Figura 3 apresenta os Difractogramas de Raio X na síntese e após o teste de injetabilidade da pasta das formulações 60% de sólidos, 1% de alginato e sem PEG (Amostra 3) e 63% de sólidos, 2% de alginato e 2,5 PEG (Amostra 8) obtidas por mistura entre o alginato, β -TCP e o uso sem PEG e com PEG, respectivamente. O difratograma das amostras realizadas apresentaram picos relativos à fase de β -TCP, Figura 3, como esperado com alta intensidade e bem definidos, identificadas pela ficha padrão *ICDD* 09-169, porém também foi observado um pequeno pico de hidroxiapatita (*ICDD* 09-4320) na posição de $31,75^\circ$, aproximadamente. Na comparação do DRX é possível notar que a aparição da hidroxiapatita inicia-se na síntese do β -TCP.

Figura 3- Análise DRX do β -TCP sintetizado e pasta de β -TCP com condições diferentes.



Fonte: Elaboração Própria

5.2 Formulação Otimizada

Com os valores obtidos da pasta ao serem inseridas nas seringas e após serem injetadas pela mini injetora, as seringas foram pesadas e através da equação de injetabilidade, Equação 1, em que a porcentagem de massa de pasta injetada é dividida pela massa inicial da pasta da seringa, apresentada na última coluna da Tabela 2, foi possível obter a porcentagem de injetabilidade de cada ensaio realizado.

Tabela 2- Cálculo para injetabilidade da pasta

Amostras	%sólidos	Alginato	PEG	% de injetabilidade
1	61,5	1,5	1,25	85,59
2	60	1	2,5	84,13
3	60	1	0	65,94
4	63	1	2,5	91,03
5	60	2	2,5	94,30
6	61,5	1,5	1,25	83,45
7	60	2	0	95,70
8	63	2	2,5	85,46
9	61,5	1,5	1,25	81,15
10	63	1	0	89,51
11	63	2	0	81,93

Fonte: Elaboração própria

Através dos resultados de porcentagem de injetabilidade com os fatores de teor de sólidos, concentração de alginato e o uso ou não de PEG, foi feito no software Minitab® algumas análises pelos resultados do planejamento fatorial podem ser obtidas levando em consideração quais são os fatores que mais sofrem influência para que ocorra uma melhor injetabilidade.

Tabela 3 - Coeficientes Codificados e valor-p

Termo	Coeficiente	Valor-P
Constante	85,999	0,000
% Sólidos	0,982	0,337
Alginato	3,348	0,051
PEG	2,731	0,074
% Sólidos*Alginato	-6,636	0,014
% Sólidos*PEG	-1,466	0,203
Alginato*PEG	-2,198	0,107
% Sólidos*Alginato*PEG	2,700	0,075
Ponto Central (Pt Ct)	-2,60	0,226

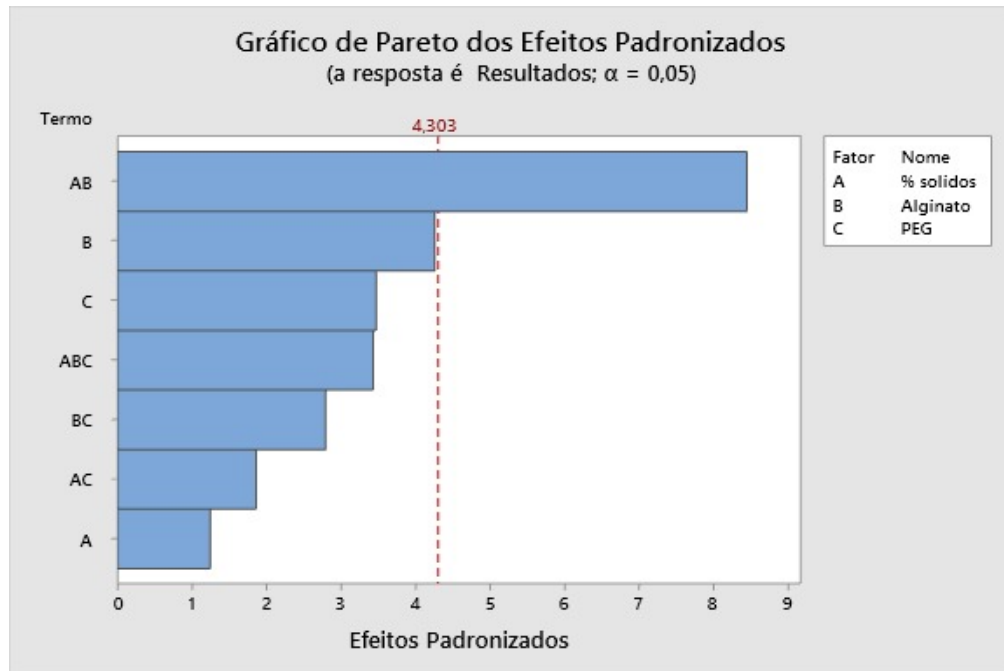
Fonte: Elaboração própria

Na Tabela 3, é possível observar em na segunda coluna os coeficientes e seus efeitos estudados no planejamento fatorial, assim como suas interações. Em valores em que a contribuição é para a diminuição da injetabilidade os valores são de efeitos do coeficiente são negativos pois ocorrem quando a interação de um fato difere do outro, como por exemplo, um fator está no nível + e outro no nível -. Caso ocorra de ambos estarem no nível + ou ambos no nível -, a injetabilidade consequentemente aumenta.

Na Figura 4, foi elaborado um gráfico de Pareto de efeitos onde foi possível observar uma linha vertical que traça a linha de referência para indicar os efeitos significativos de modo estatístico. Neste caso, os fatores que mais influenciam sua significância é a alteração combinada de diferentes fatores, ou seja, a variação da resposta causada pela variação que ocorre no nível de um fator dependa do nível de outro fator, este chamado de efeito de interação.

No caso do experimento realizado, os fatores significativos é o de interação do fator de porcentagem de sólidos (A) com alginato (B), com valor- p de 0,014, Tabela 3, pois com os maiores valores de porcentagem de sólidos com alginato (+ +) na pasta eleva a viscosidade da pasta, desse modo ao injetar a pasta na impressão 3D, as camadas de pasta não terão uma boa adesão, assim como os menores valores de sólidos e alginato (- -) também influenciaram na má injetabilidade da pasta. Baseado nisso, o ideal para que a pasta tenha uma boa injetabilidade e viscosidade é a relação AB, sendo - +, respectivamente.

Figura 4- Gráfico de Pareto



Fonte: Elaboração própria

Porém, apesar dos fatores com maior influência de injetabilidade serem as interações entre os fatores % sólidos e alginato (ou seja, fatores AB), o uso do PEG apesar de não ter promovido aumento significativo na injetabilidade da pasta, é um aditivo necessário e relevante pois através deste aditivo há uma contribuição para a que a pasta funcione na impressão 3D com uma adesão entre as camadas a serem impressas.

Como os fatores relevantes neste caso são os fatores AB é possível representar uma equação para o modelo deste experimento (Equação 2) e baseado nos sistema para uma equação simplificada (Equação 3) com os três termos A,B e AB e o PEG, pois o uso dele traz benefícios para a peça *scaffold*.

$$\text{Injetabilidade} = 85,999 + 0,982 \text{ \%sólidos} + 3,348 \text{ Alginato} + 2,731 \text{ PEG} - 6,636 \text{ \% sólidos} * \text{Alginato} - 1,466 \text{ \% Sólidos} * \text{PEG} - 2,198 \text{ Alginato} * \text{PEG} + 2,700 \text{ \% Sólidos} * \text{Alginato} * \text{PEG} - 2,60 \text{ Pt Ct}$$

Equação 2

$$\text{Injetabilidade Simplificada} = 85,999 + 0,982 \% \text{sólidos} + 3,348 \text{ Alginato} - 6,636 \% \text{sólidos} * \text{Alginato}$$

Equação 3

Ao organizar a sequência dentre os melhores ensaios com boa injetabilidade, destacou-se o ensaio 7, que pode ser considerado como um ponto ótimo de condição, indicando um estado de eficiência máxima do sistema.

Comprova-se a veracidade da informação ao comparar os resultados de injetabilidade (Tabela 2), visto que as porcentagens de melhor injetabilidade consistem nos valores de 95,7% e 94,3%, porém como é necessário a utilização do PEG devido a sua boa estabilidade e adesão na peça final para impressão 3D, as condições ideais ao utilizar a pasta de β -TCP para impressão 3D com a formulação otimizada é de 60% de β -TCP, 2% de alginato e 2,5 de PEG com injetabilidade de 94,3%.

6 CONCLUSÃO

As análises por difratometria de raio x indicaram a presença da fase de β -TCP como esperado, além da presença de um pequeno pico de hidroxiapatita. Esse pico é observado desde a análise da síntese, indicando que ocorreu algum erro experimental durante a síntese.

Através do planejamento de experimento em que defini quais dados e condições devem ser coletados durante a realização do experimento, permitindo uma maior confiabilidade dos resultados, foi possível analisar que a injetabilidade apresentou melhores resultados com 60% de alginato, 2% de β -TCP peneirado com 95,7% de injetabilidade sem a presença de PEG, mas considerando injetabilidade vs. adesão a pasta que obteve a melhor condição de uso para impressão 3D foi com o uso do PEG, por esse motivo foi escolhida a condição com injetabilidade de 94,3%.

Neste trabalho conclui-se que o estudo com ensaios com diferentes que mais possuem influência para uma boa injetabilidade ocorre quando há interações entre os fatores % sólidos e alginato juntamente ao uso do PEG, apresentando melhores propriedades para aplicação a qual é destinada, além de possuir uma boa fluidez e adesão para a peça *scaffolds*.

7 REFERÊNCIAS

- [1] KAWACHI, E. Y. et al. **Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar**, Quim. Nova. 23 (2000) 518–522.
- [2] HEIMANN, R. B. **Materials science of crystalline bioceramics: A review of basic properties and applications**, J. C. 1 (2002) 23–46.
- [3] SAENZ, A & Brostow, Witold & Rivera-Muñoz, Eric. (1999). **Ceramic biomaterials: An introductory overview**. Journal of Materials Education. 21. 297-306.
- [4] MADRID A. P., Vrech S., Sanchez M., Rodriguez A. **Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds**. Materials Science and Engineering, v.100, (2019) 631-644,
- [5] SOARES L, Oliveira AF, Oliveira S, Paula A, Machado L, Rosa FP. **Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras**. 2010; 9:37–44.
- [6] H. CHAIR, H. Labjar, O. Britel. **Synthesis of β -tricalcium phosphate**. Materials Science and Engineering, v.101, 2017. 120-124
- [7] M. VALLET-REGÍ, A.J. SALINAS. **Ceramics as bone repair materials**, 2009, p. 194-230.
- [8] BO LI, Zhongning Liu, Jingwen Yang, Zhongchao Yi, Wenqian Xiao, Xue Liu, Xiaoling Yang, Wenfeng Xu, Xiaoling Liao. **Preparation of bioactive β -tricalcium phosphate microspheres as bone graft substitute materials**. Materials Science and Engineering: C, v70, Part 2, 2017, 1200-1205.
- [9] ZHU, Y., WAGNER, W. **Design principles in biomaterials and scaffolds. Principles of regenerative medicine**. Elsevier, pp. 505-522, 2019.
- [10] BOSE, S., ROY, M. & BANDYOPADHYAY, A. **Recent advances in bone tissue engineering scaffolds**. Trends in Biotechnology, vol. 30, pp. 546-554, 2012.
- [11] SERGEY V. Dorozhkin, **Calcium orthophosphate bioceramics**, Ceramics International, V. 41, Issue 10, Part B, 2015, P. 13913-13966.
- [12] LANGER, R., & Vacanti, J. (1993). **Tissue engineering**. Science, 260(5110), 920–926.
- [13] R. SKALAK and C. F. Fox, Eds., **Tissue Engineering** (Liss, New York, 1988); R. M. Nerem, Ann. Biomed. Eng. 19, 529 (1991).
- [14] YARTZOFF M. **Defining Tissue Engineering. Biomedical Sciences** - Elsevier, 2018.
- [15] F. SILVER and C. Doillon. **Biocompatibility: Interactions of Biological and Implantable Materials**. VCH., 1989.

- [16] RATNER, B.; HOFFMAN, A. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2nd editio. ed. [S.l.]: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 0125824637.
- [17] Digital Journal. **Biomaterials Market worth USD 149.17 Billion by 2021** - Press Release - Digital Journal. 2017.
- [18] WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987.
- [19] CALLISTER, W. **Introdução**. In: **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5.ed. São Paulo: LTC, 2002. ISBN 8521612885.
- [20] BORIS Michael Holzapfel, Johannes Christian Reichert, Jan-Thorsten Schantz, Uwe Gbureck, Lars Rackwitz, Ulrich Nöth, Franz Jakob, Maximilian Rudert, Jürgen Groll, Dietmar Werner Hutmacher, **How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view**. Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 65, Issue 4, 2013, p. 581-603, ISSN 0169-409X.
- [21] NOORT, R. V. **Introdução aos materiais dentários**, 3rd ed., Rio de Janeiro, 2010.
- [22] AZA, P. N. de; De Aza, S. **Biocerâmicas**. In: SASTRE, R.; AZA, S. de; ROMÁN, J. S. (Ed.). Biomateriales. Faenza: Faenza Editrice Iberica, 2004. p. 41–64. ISBN 84-87683-26-6.
- [23] PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. **Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado**. 2015. 957–971 p.
- [24] DOROZHUKIN, S. **Bioceramics of calcium orthophosphates**. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1465–85, 2010. ISSN 1878-5905.
- [25] ARCOS, D.; VALLET-REGÍ, M. **Bioceramics for drug delivery**. Acta Materialia, v. 61, n. 3, p. 890–911, 2013. ISSN 13596454.
- [26] SHANMUGAM, K., & Sahadevan, R. (2018). **Bioceramics—An introductory overview**. Fundamental Biomaterials: Ceramics, 1–46)
- [27] ALBEE, F. H., and Morrison, H. F. **Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis**, *Ann. Surg.* 71:32, 1920.
- [28] HALDEMAN, K.O. and Moore, J.O., *Arch. Surg.* 1934,29,385.
- [29] R. ORÉFICE, M. Pereira, and H. Mansur, **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. 2006.
- [30] M. YASHIMA, A. Sakai, T. Kamiyama, and A. Hoshikawa. **Crystal structure analysis of [beta]-tricalcium phosphate Ca₃(PO₄)₂ by neutron powder diffraction**, *J. Solid State Chem.*, vol. 175, pp. 272–277, 2003.
- [31] S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian, and J. Huang, “**Bioceramics : Past , present and for the future**,” vol. 28, pp. 1319–1327, 2008.

- [32] BOHNER, M. **Designing ceramics for injectable bone graft substitutes**, in: RMS Found. Woodhead Publishing Limited, 2011.
- [33] Maria P. Nikolova, Murthy S. Chavali. **Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review**. Bioactive Materials, vol. 4, p. 271-292, 2019. ISSN 2452-199X.
- [34] SHANGSI Chen, Yufei Shi, Xin Zhang, Jun Ma. **3D printed hydroxyapatite composite scaffolds with enhanced mechanical properties**. Ceramics International, vol 45, Issue 8, 2019, p. 10991-10996.
- [35] A. BUTSCHER, M. Bohner, S. Hofmann, L. Gauckler, R. Muller, **Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing**, Acta Biomater 7(3) (2011) 907-920.
- [36] KUMAR, A. et al. **Low temperature additive manufacturing of three dimensional scaffolds for bone-tissue engineering applications: Processing related challenges and property assessment**. Materials Science and Engineering R: Reports, v. 103, p. 1–39, 2016. ISSN 0927796X.
- [37] MAAZOUZ, Y. et al. **Robocasting of biomimetic hydroxyapatite scaffolds using self-setting inks**. Journal of Materials Chemistry B, v. 2, n. 33, p. 5378, 2014. ISSN 2050-750X.
- [38] BERGMANN, C. et al. **3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses**. Journal of the European Ceramic Society, v. 30, n. 12, p. 2563–2567, 2010. ISSN 09552219.
- [39] MONTUFAR, E. B.; MAAZOUZ, Y.; GINEBRA, M. P. **Acta Biomaterialia Relevance of the setting reaction to the injectability of tricalcium phosphate pastes**, Acta Biomater. 9 (2013) 6188–6198.
- [40] U. GBURECK, J. E. Barralet, K. Spatz, L. M. Grover, and R. Thull, “**Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: Hypodermic injection and strength improvement of apatite cement**,” Biomaterials, vol. 25, no. 11, pp. 2187–2195, 2004.
- [41] LEE, K. Y.; MOONEY, D.J. **Alginate: Properties and biomedical applications**, Prog. Polym. Sci. 37 (2012) 106–126.
- [42] ARAUJO, A.F; Alves, A.P.N; TRICHES, E.S; MOTISUKE, M. **Desenvolvimento e manufatura de uma mini injetora para pastas cerâmicas**, 2019. (Apresentação SICEMAT)
- [43] Minitab, LLC (2019). “Planejar um experimento,” *Introdução ao Minitab 19*, p. 35-42.